

ОБ АЛГОРИТМИЧЕСКОМ ПОДХОДЕ РАСПОЗНАВАНИЯ КЛЕТОК СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПО ФОТОИЗОБРАЖЕНИЯМ

И.А. Колесникова^{1,2}, Н.Н. Буденная^{1,2}, Ю.С. Северюхин^{1,2}, М.Г. Лалковичова^{1,3}

¹ *Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований,
Дубна, Россия*

² *Университет «Дубна», г. Дубна, Московская область, ул. Университетская, 19*

³ *Slovak Academy of Sciences, Institute of Experimental Physics, Kosice, Slovakia*

E-mail: innakolesnikova@jinr.ru

Работа посвящена исследованию влияния ионизирующего излучения на центральную нервную систему (ЦНС) лабораторных животных. Сектор радиационной физиологии ЛРБ ОИЯИ изучает последствия облучения на клеточном и организменном уровнях. Экспериментальных животных облучают протонами или гамма-квантами в медико-техническом комплексе (МТК) ОИЯИ. Забор биологического материала, его фиксация и проводка, микромирование, окрашивание, микроскопия и создание фотоизображений микропрепаратов занимают от двух недель и более, а морфологический анализ приготовленных гистологических препаратов занимает от полугода. Достижения применения искусственных нейронных сетей в медико-биологической сфере свидетельствуют о возможности автоматизировать этап анализа гистологических препаратов. Цель данной работы - показать эффективность современных алгоритмов компьютерного зрения и методов машинного обучения для автоматизации этапов морфологического анализа микропрепаратов головного мозга экспериментальных животных после облучения ионизирующим излучением. Таким образом, увеличивается скорость получения качественных результатов и уменьшается субъективность подхода обработки экспериментальных данных.

Ключевые слова: морфологический анализ, нейроны, радиобиология, информационный анализ, ионизирующее излучение

Инна Колесникова, Наталья Буденная, Юрий Северюхин, Мария Лалковичова

Copyright © 2020 for this paper by its authors.

Use permitted under Creative Commons License Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

1. Введение

Важность изучения последствий радиационного воздействия на ЦНС млекопитающих обусловлена ростом популярности протонной терапии при лечении онкологических заболеваний головного мозга, повышению интереса к освоению дальнего космоса, а также необходимостью разработки эффективных методов защиты персонала, работающих с источниками ионизирующего излучения.

Существует большое число исследований, описывающих структурно-функциональные изменения ткани головного мозга после воздействия излучением различного качества. Однако механизмы действия облучения и наблюдаемые эффекты в ЦНС в различные сроки после воздействия еще недостаточно изучены. В ранний период развития радиобиологии превалировало мнение, что ЦНС - это высокорезистентное образование. В дальнейшем на смену пришло мнение о высокой радиочувствительности отдельных структур (в которых наблюдается нейрогенез) головного мозга млекопитающих. Было установлено, что ЦНС - это «критическая» система при оценке риска радиационного воздействия на организм космонавтов в условиях длительных межпланетных полетов вне магнитосферы Земли [2]. Действие ионизирующих излучений на ЦНС вызывает комплекс сложных биохимических и морфофизиологических реакций. Известно, что через 3 месяца после облучения изменения проявляются в выраженных нарушениях пространственной ориентации, угнетении когнитивных функций [3]. Результаты исследований морфофункциональных изменений в головном мозге в краткосрочные и долгосрочные периоды после облучения протонами в разных дозах описаны в работах коллектива К.Н. Ляховой и др. [4,5].

Не менее актуальны работы по изучению радиопротекторных свойств фармакологических препаратов, внедрение которых поможет расширить спектр средств, повышающих радиорезистентность организма. Результаты исследований могут быть полезны при разработке эффективных методов профилактики и защиты персонала, работающего с источниками ионизирующего излучения, а также и для пациентов, получающих лечение в виде радиотерапии.

Таким образом, на современном этапе развития радиобиологии чрезвычайно важно накопление знаний об особенностях формирования радиационных повреждений после воздействия ионизирующим излучением разного качества в различные сроки после облучения.

В ходе радиобиологических исследований возникает необходимость анализа большого количества разнородных экспериментальных данных. Переход к передовым цифровым технологиям, таким как машинное обучение, нейросетевые подходы и высокопроизводительные вычислительные технологии для решения подобного класса задач позволит в короткие сроки получать значимые результаты мирового уровня, которые могут быть использованы в космической радиобиологии и радиационной медицине [6-9].

В современных междисциплинарных задачах диагностики состояния объектов использование методов анализа биологических образцов в видимом диапазоне электромагнитного излучения позволяет выявить важные признаки онкологических заболеваний. Здесь необходим комплексный подход с применением физических, кибернетических, биологических и прочих методов исследований.

2. Радиобиологические эксперименты. Материалы и методы

Воздействие ионизирующим излучением и фармакологическими агентами исследуются на лабораторных животных (крысы, мыши). В зависимости от цели исследования используют определенные линии грызунов. Экспериментальных животных делят на группы (например, группа контроля и облученные). Крысы и мыши содержатся раздельно в виварном блоке, который оснащен современным компьютеризированным оборудованием. Облучение гамма-квантами или протонами проходит в МТК ОИЯИ. В зависимости от поставленных целей исследователи выбирают сроки, в которые после облучения будут проанализированы поведенческие паттерны и проведен морфологический анализ клеток головного мозга экспериментальных животных.

После облучения грызунов тестируют с помощью установок “Открытое поле”, “Т-лабиринт” и другие (НПК Открытая Наука, Россия). По завершении этапа исследования поведения у лабораторных животных берется биологический материал: головной мозг, кровь, тимус, селезенка, бедренная кость, тонкий кишечник, большая доля печени, почка и пр. Животных умерщвляют методом декапитации. Биологический материал фиксируют в 10% забуференном формалине. Головной мозг может быть зафиксирован отдельно в растворе Карнуа. Патоморфологическое исследование проводится на приготавливаемых по стандартной гистологической технике срезах головного мозга. Микропрепараты готовятся на микротоме Thermo scientific Microm HM 340E. Срезы окрашиваются крезилвиолетом по методу Ниссля, или гематоксилин-эозином, или флуоресцентным красителем Fluoro Jade B, или другим красителем, подобранным под поставленные задачи исследования (рис.1). При окрашивании используются ксилол, спирты различных концентраций, дистиллированная вода. Микроскопия проводится на микроскопе Biomed-6 тринокуляр с использованием Tourcam 3.1MP ½ Aptina cmos UC MOS03100KPA цифровой камеры.

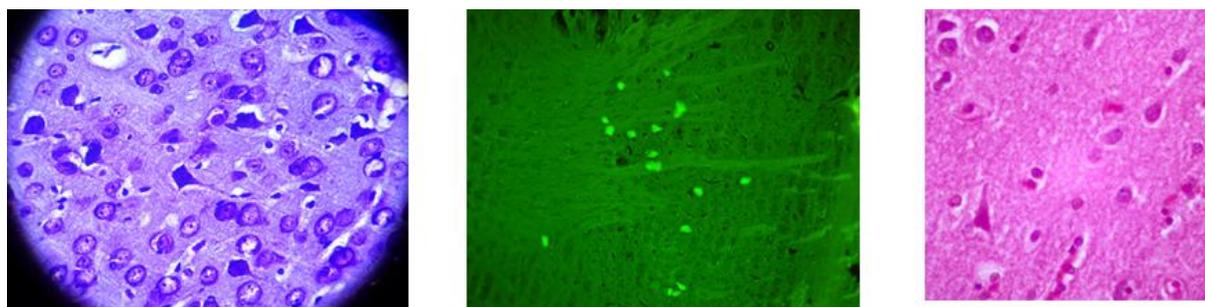


Рис. 1. Примеры окрашивания микропрепаратов крезилвиолетом, FluoroJB и гематоксилин-эозином

Возможности работы с микропрепаратами расширились за счет цифровых камер для микроскопов и специализированных программ. Это позволяет фотографировать материал, создать базу фотоизображений микропрепаратов, при необходимости вернуться к анализу фотографии препарата, зафиксировать наиболее интересные и важные участки и случаи, хранить архив изображений. Фотоизображения исследуемой структуры нервной ткани готовятся с помощью цифровой камеры и программы Tour View при увеличении микроскопа 40x10 (рис.2).

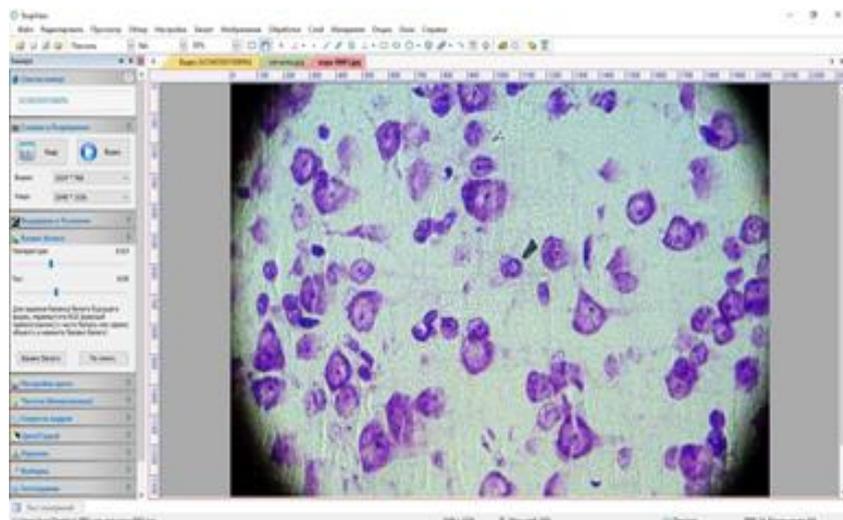


Рис. 2. Фотография гистологического препарата головного мозга с помощью программы ToupView

Далее специалист в области патоморфологии анализирует фотоматериал. Проводится качественный и количественный анализ клеток головного мозга - нейронов. Используется система широкого назначения ImageJ (рис.3). С помощью которой фотографии гистологических препаратов аннотируются применяя классификацию по степени изменения нейронов, так и выделяя глиальные клетки и элементы нервной ткани, которые не могут быть проанализированы.

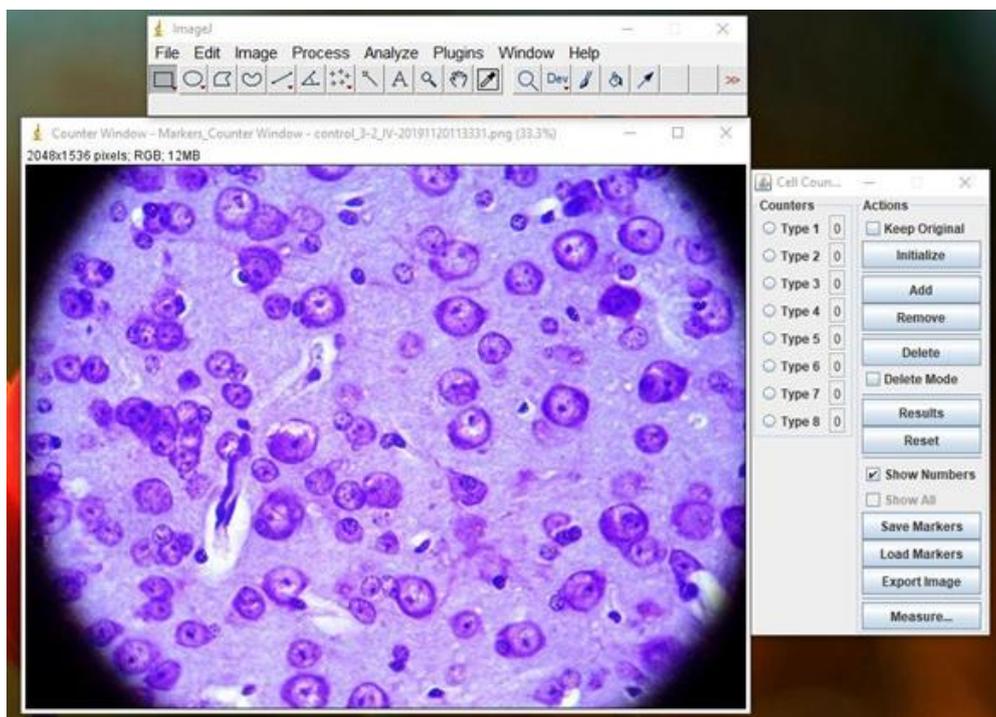


Рис. 3. Работа с фотоизображением гистологического препарата коры головного мозга в программе ImageJ

В зависимости от степени структурных нарушений нейронов головного мозга выделяют следующие группы:

1) нейроны без видимых изменений - нормохромные (рис.4);

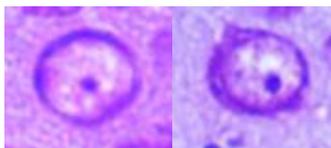


Рис. 4. Нейроны головного мозга без нарушений

2) морфофункциональные, к которым относятся нейроны с изменением величины и формы, с вакуолизацией цитоплазмы и небольшим отеком, гипохромные нейроны, цитоплазма которых имеет неравномерную окраску, что соответствует различным видам хроматолиза (центрального, апикального, сегментарного). Ядра в гипохромных нейронах светло окрашены, обычно увеличены в объеме. К морфофункциональным изменениям относят и гиперхромные клетки, ядра их обычно уменьшены в объеме и четко контурированы. К группе признаков компенсаторно-приспособительных процессов относятся: гипертрофия нейронов, увеличение объемов ядра и ядрышка, смещение их на периферию, складчатость и гиперхромия ядерной мембраны, а также двухядерные и сближенные нейроны (рис.5).

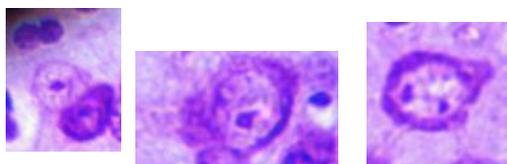


Рис. 5. Нейроны головного мозга с компенсаторно-приспособительными и морфофункциональными изменениями

3) дистрофические изменения (рис.6). К этой группе изменений относятся клетки с резко выраженным отеком цитоплазмы, приводящим к разрушению ядра, тотальным хроматолизом, нейроны, цитоплазма которых содержит крупноячеистые вакуоли и мелкие вакуоли в ядре, “ишемические клетки”, клетки-тени, Самым частым проявлением дегенеративных процессов являются пикноморфные клетки. Они имеют удлиненно-веретенообразную форму и уменьшены в размер. Отростки интенсивно окрашены и прослеживаются на значительном расстоянии. Цитоплазма таких клеток гомогенизирована, интенсивно окрашена, в ряде случаев не просматривается граница ядра. Клетки тени характеризуются грубым разрежением и запустением цитоплазмы, отсутствием ядра и ядрышка, представлены лишь тенью, окруженной гипертрофированными глиоцитами. К этой же группе изменений относятся очаги выпадения.

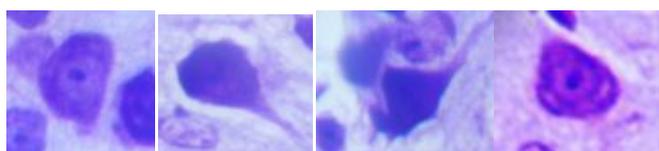


Рис. 6. Нейроны головного мозга с дистрофическими изменениями

Для получения количественных данных определяют процентное соотношение нейронов без видимых изменений, с легкообратимыми (морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными признаками) и дистрофическими изменениями.

Программа ImageJ позволяет разметить фотоизображение микропрепарата и сохранить их в png, jpeg и других форматах, сохранить результаты количественного

подсчета в csv или xls форматах, а также дает информацию о координатах размеченных на снимке элементов, что может быть полезно при написании программного кода на языке Python для дальнейшего обучения сверточной нейронной сети (СНС) (рис.7).

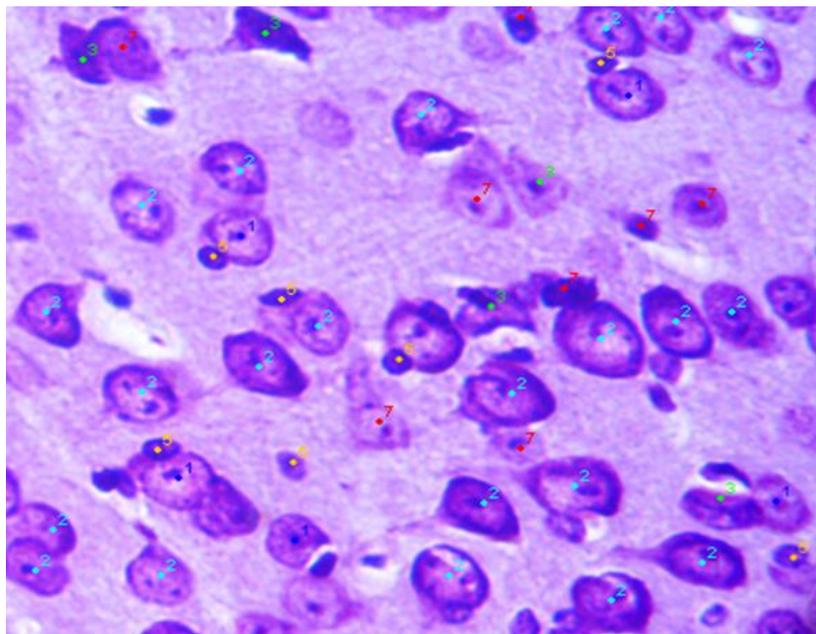


Рис. 7. Анализ фотоизображения с помощью ImageJ plugin CellCounter: “1” - нейроны без нарушений, “2” - нейроны с компенсаторно-приспособительными и морфофункциональными изменениями, “3” - дистрофические нейроны, “5” - глия, “7” - объекты нервной ткани, которые не подлежат анализу

Для создания базы размеченных изображений были взяты фотографии гистологических препаратов двух экспериментов.

Эксперимент №1. Цель проведенного эксперимента - исследование изменений в поведении старых мышей после облучения гамма-квантами на 30-е сутки. Эксперимент был проведен на самцах линии ICR, возраст семь месяцев. Животные были облучены тотально гамма-квантами Co^{60} в дозе 2 Гр, мощность дозы 0,505 Гр/мин, изодоза 90%, РИП = 75 см на установке «Рокус-М», МТК ОИЯИ. Экспериментальные мыши были поделены на две группы: облученные и интактный контроль. Животные были протестированы в установке “Открытое поле” на 33-и сутки и умерщвлены на 34 день после облучения. Препараты для микроскопии готовили, используя общепринятые методы гистологической обработки тканей млекопитающих: головной мозг фиксировали в 10% формалине с $ph = 6.8$ и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы 8 мкм окрашивали крезилвиолетом. Нейроны сенсомоторной коры головного мозга классифицировали по степени изменения: без патологических нарушений, с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, дегенеративные.

Эксперимент №2. Цель работы - оценка влияния тотального фракционного гамма-облучения на поведенческие реакции половозрелых крыс и морфологические изменения в гиппокампе, а также изучение нейрозащитных свойств пираретама при данном воздействии. Для оценки влияния препарата на гематологический статус животного, также был проведен расчет числа лейкоцитов в периферической крови. Исследование выполнено на 15 самцах крыс линии SD в возрасте 8 месяцев с массой тела 500-600 гр. Крысы подверглись тотальному фракционированному облучению гамма-квантами Co^{60} в суммарной дозе 5 Гр на установке «Рокус» (МТК ОИЯИ).

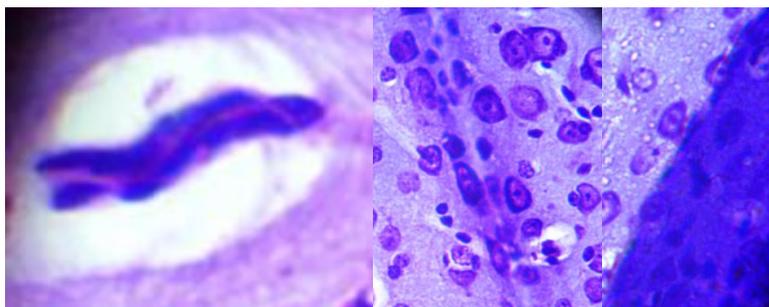
Мощность дозы составляла 0,5 Гр/мин. РИП – 75 см. Животные были разделены на три группы: группа 1 - контрольные животные в ходе 14 дней эксперимента получали внутривентрикулярные инъекции хлорида натрия 0,9 % по 0,5 мл; группа 2 – облученные животные, подвергнутые фракционированному гамма-облучению Co^{60} в дозе 0,5 Гр/день (10 фракций) с перерывом на выходные и так же получала внутривентрикулярные инъекции хлорида натрия 0,9 % по 0,5 мл; группа 3 – облученные животные, получавшие внутривентрикулярные инъекции парацетамола по 0,5 мл в расчете 100 мг/кг массы животного после аналогичного фракционированного гамма- облучения для группы 2. Животные были умерщвлены на 19 день от начала эксперимента. Препараты для микроскопии готовили, используя методы гистологической обработки тканей млекопитающих: головной мозг фиксировали в жидкости Карнуа и заливали в парафиновые блоки, гистологические срезы (7 и 10 мкм) окрашивали крезилвиолетом по методу Ниссля и Fluoro Jade В соответственно. Проведен качественный и количественный анализ нейронов сенсомоторной коры головного мозга. Идентифицировали клетки без патологических нарушений, с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, дегенеративные нейроны. Статистическую значимость рассчитывали по критерию ANOVA ($p \leq 0.05$).

Животные содержались на стандартном рационе со свободным доступом к воде и корму. Содержание и все процедуры над животными выполнялись в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г.) и “Международным рекомендациям по проведению биомедицинских исследований с использованием животных” Совета международных медицинских организаций (CIOMS), Женева 1985 г. Крысы контрольной группы подвергались тем же процедурам (транспортировка, помещение в контейнеры) что и животные экспериментальных групп.

Фотоизображения микропрепаратов биологического материала размечаются разными способами с целью выявить оптимальный для эффективного обучения искусственной нейронной сети (ИНС). Первый способ разметки основан на создании маски. Использована классификация нейронов головного мозга: нормальные клетки, легкоизмененные (морфофункциональные и компенсаторно-приспособительные) и дегенеративные. Данный способ применен к фотоматериалам в количестве более 200 штук из эксперимента №2. Фотоизображения микропрепаратов из эксперимента №1 аннотируются иным способом. Помимо вышеуказанной классификации нейронов сенсомоторной коры по степени изменения отмечаются глиальные клетки. Отдельно выделяются элементы нервной ткани и артефакты, которые не могут быть проанализированы и их не следует использовать для обучения ИНС.

Сложности анализа могут быть обусловлены следующими факторами:

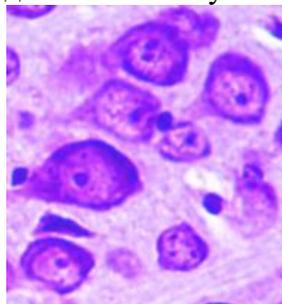
а) на микропрепарате могут присутствовать объекты, которые нейронами не являются (частички грязи, погрешности окрашивания, складки ткани, и другие артефакты);



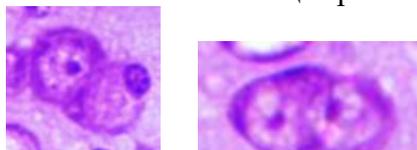
б) нейроны могут заметно отличаться друг от друга как по размеру, так и по форме;



в) нейроны могут быть повреждены в процессе подготовки срезов, что влияет на их форму и как следствие - приводит к большому числу разнотипных клеток на срезе;



г) нейроны могут «слипаться» или в толще среза накладываться друг на друга.



3. Состояние проблем при проведении радиобиологических экспериментов сектора №3 ЛРБ и пути их решения

Основные проблемы при проведении радиобиологических исследований:

1. обработка данных вручную;
2. большие временные затраты на обработку полученных экспериментальных данных на ПО;
3. недоработки имеющегося ПО и, как следствие, ограничения в условиях проведения экспериментов или увеличении времени обработки данных вручную;
4. риск потери информации;
5. отсутствие единого хранилища со всеми экспериментальными данными;
6. недоступность данных одновременно всем участникам эксперимента;
7. нюансы статистического анализа биологических данных и адаптации сторонних программ.

Решение поставленных проблем сводятся к решению следующих задач:

- планирование и проведение радиобиологических экспериментов;
- сбор биологических данных;
- анализ данных (применение методов машинного и глубокого обучения и нейросетевых подходов для автоматической обработки цифровых данных по экспериментам - разработка программной компоненты для имеющегося ПО, СНС для морфологического анализа ЦНС);
- сбор и хранение данных в едином информационном пространстве посредством разработки адаптивного веб-сервиса;
- статистический анализ как дополнительная компонента к сервису.

Подготовка фотоизображений препаратов крупных структур головного мозга (сенсомоторная кора, мозжечок) занимает несколько дней. В среднем необходимо сделать 30-40 фотографий сенсомоторной коры, чтобы посчитать 1000 клеток с одного

микропрепарата, в виду статистического анализа. 1 микропрепарат – 1 срез головного мозга 1 животного. В эксперименте минимум 2 группы животных (контроль и облученные) по 10 штук. Получается от 600 до 1000 фотоизображений сенсомоторной коры головного мозга с одного эксперимента. Эта цифра может быть увеличена, если исследуемых групп больше или препараты окрашивались несколькими красителями. Одно изображение в среднем занимает 7 Мб. Так же эта цифра увеличивается после обработки фотографии при морфологическом анализе. Таким образом встает проблема хранения данных. Ведется письменное сопровождение о всех деталях проводимого анализа. База фотокадров структур головного мозга регулярно пополняется. Ресурс персонального компьютера ограничен. Данные накапливаются. Для некоторых случаев необходимо мнение нескольких специалистов в области нейрогистологии, патоморфологии, нейропатологии, поскольку это нетривиальные сферы. Приходится пересылать данные, пользоваться съемными носителями, что неудобно и времязатратно. Это показывает необходимость создания общего сервиса хранения, где участники эксперимента могут работать с данными в одном пространстве.

4. Заключение

В работе рассмотрена эффективность создания единой информационной системы для хранения экспериментальных данных исследовательской группы, а также последовательность работы алгоритма эксперимент-обработка данных. Важным элементом разрабатываемой платформы будет внедрение алгоритма глубинного и машинного обучения. Это позволит автоматизировать этап морфологического анализа в радиобиологических исследованиях. Использование единого информационного пространства упростит и ускорит комплексный анализ экспериментальных данных.

Список литературы

- [1] Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. М.: Высшая школа, 2004. С.549
- [2] Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К оценке риска биологического действия галактических тяжелых ионов в условиях межпланетного полета // Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2013. – Т. 99. – №. 3. – С. 273-280.
- [3] Федоренко Б.С., Шафиркин А.В., Буденная Н.Н. Морфологические изменения в центральной нервной системе животных в зависимости от дозы и времени после воздействий излучений с различными значениями ЛПЭ //Авиакосм. и эколог. мед. – 1998. – Т. 32. – №. 3. – С. 4.
- [4] Ляхова К.Н. и др. Морфофункциональные показатели воздействия протонов на центральную нервную систему // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2019. – Т. 64. – №. 2. – С. 75-81.
- [5] Ляхова К.Н. и др. Влияние препарата “СЕМАКС” на жизненный статус и морфологические изменения в головном мозге мышей при облучении протонами // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59. – №. 2. – С. 191-199.
- [6] Gurcan M. N. et al. Histopathological image analysis: A review // IEEE reviews in biomedical engineering. – 2009. – Т. 2. – P. 147-171.

- [7] Shen D., Wu G., Suk H. I. Deep learning in medical image analysis // Annual review of biomedical engineering. – 2017. – Т. 19. – P. 221-248.
- [8] Komura D., Ishikawa S. Machine learning methods for histopathological image analysis // Computational and structural biotechnology journal. – 2018. – Т. 16. – P. 34-42.
- [9] Лукашевич М. М., Старовойтов В. В. Методика подсчета числа ядер клеток на медицинских гистологических изображениях // Системный анализ и прикладная информатика. – 2016. – №. 2.

ALGORITHMIC APPROACH TO THE RECOGNITION OF CELLS IN THE SENSORIMOTOR CORTEX FROM MICROPHOTOGRAPHS

I.A. Kolesnikova^{1,2}, N.N. Budennaya^{1,2}, Yu.S. Severyukhin^{1,2}, M.G. Lalkovicova^{1,3}

¹ *Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia*

² *Federal State-Funded Educational Institution of Higher Education of Moscow Region “Dubna University”, Dubna, Russia*

³ *Slovak Academy of Sciences, Institute of Experimental Physics, Kosice, Slovakia*

E-mail: innakolesnikova@jinr.ru

The aim of the work is to study the effect of ionizing radiation on the central nervous system of laboratory animals. The Sector of Radiation Physiology of LRB JINR studies the effects of radiation on the cellular and organismal levels. Experimental animals are irradiated with protons or gamma rays in the JINR Medico-Technical Complex. The collection of biological material, its fixation, slicing, staining, microscopy and the creation of photographic images of the samples take two weeks or more, and the morphological analysis of the histological preparations takes approximately six months. Achievements in the application of artificial neural networks in the biomedical field indicate the possibility of automating the stage of analysis of histological preparations. The purpose of this work is to show the effectiveness of modern computer vision algorithms and machine learning methods for automating the stages of the morphological analysis of micropreparations of the brain of experimental animals after exposure to ionizing radiation. Thereby the speed of obtaining qualitative results increases, and the subjectivity of the approach to processing experimental data decreases.

Keywords: morphological analysis, neurons, radiobiology, information analysis, ionizing radiation

Inna Kolesnikova, Natalya Budennaya, Yuri Severiukhin, Maria Lalkovicova

Copyright © 2020 for this paper by its authors.

Use permitted under Creative Commons License Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).